

Remoción biológica de nitrógeno y fósforo en aguas residuales por parte de microalgas y bacterias co-inmovilizadas

Zaballa I.J.¹, Zanon M.¹, Cuello C.², Gori J.I.¹, Vaccaro R.³, Ribaldo C.M.¹

¹ Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 1417

² Centro QUIMOBÍ, Universidad Tecnológica Nacional, Argentina

³ Cátedra de Economía, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina

e-mail: zaballa@agro.uba.ar

RESUMEN

Las aguas residuales provenientes de la explotación ganadera intensiva, los lixiviados de la gestión de residuos sólidos urbanos (RSU) y las aguas residuales domiciliarias, contienen niveles de nitrógeno (N) y fósforo (P) que, a pesar de ser los nutrientes más importantes para el crecimiento vegetal, pueden resultar contaminantes si llegan a un cuerpo receptor natural sin previo tratamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de microalgas y bacterias co-inmovilizadas en cápsulas de alginato, para remover N y P presentes en las aguas residuales provenientes de la gestión de RSU; y reutilizar las capsulas como biofertilizante sobre cultivos de interés agrícola. En los distintos tratamientos se utilizó microalgas del genero *Chlorella vulgaris* (CV), bacterias del genero *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (PAC) y una combinación de ambas (CV+PAC). Como agua residual se utilizó un medio sintético con agregado de N y P en forma de sales NO₃K y KH₂PO₄, respectivamente; y las cápsulas recuperadas se aplicaron para fertilizar plantas de tomate. En cuanto a los resultados de remoción de N y P, la mayor eficiencia se observó en los tratamientos en que coexistieron ambos microorganismos (CV+PAC). Para los distintos tratamientos, a las 48 horas (h) se alcanzaron los valores de remoción más elevados, el porcentaje de remoción de P estuvo entre 64 a 75 %; y el de N estuvo entre 90 y 94 %. En cuanto a la promoción del crecimiento en tomate, se observó una tendencia al aumento de peso seco radical en los tratamientos en que PAC estuvo presente, y podría deberse a un efecto hormonal ejercido por la bacteria.

Palabras clave: PGPRs, Microalgas, Remoción biológica.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los cultivos vegetales se encuentra limitado por el abastecimiento de nutrientes minerales, principalmente de nitrógeno (N) y de fósforo (P), tanto por la magnitud de su demanda, como por su variabilidad en el suelo. Con el objetivo de lograr mayores rendimientos, la intensificación de la agricultura aumentó la dependencia y el uso irracional de fertilizantes y agroquímicos, lo cual está causando algunos efectos negativos en los ecosistemas y en asentamientos urbanos cercanos a su aplicación (Gerhardson, B. 2002; El Hadrami et al., 2011). En contraposición, las aguas residuales provenientes de centros urbanos y la generada en la gestión de residuos sólidos urbanos (RSU) o por la explotación ganadera intensiva; contienen compuestos ricos en N y P y pueden resultar perjudiciales si no reciben tratamiento previo a su descarga a un cuerpo receptor.

El uso de microalgas para remover nutrientes de las aguas residuales es una tecnología conocida, aunque no utilizada frecuentemente. Su importancia radica en que son capaces de eliminar la mayoría del nitrógeno inorgánico (amonio y nitratos) y parte del fósforo por absorción celular directa (Tam & Wong, 2000). Además pueden eliminar metales pesados de la corriente líquida, entre otras aplicaciones biotecnológicas de microalgas inmovilizadas (Lebeau & Robert, 2006; Moreno & Garrido, 2008). Por otra parte, las bacterias heterótrofas son muy utilizadas para el tratamiento de aguas residuales por su eficiencia en la remoción del carbono orgánico, aunque limitada capacidad de remover nutrientes inorgánicos como el N y el P. Así con la combinación de bacterias y microalgas autótrofas, se puede superar esta limitación y lograr un tratamiento eficiente de las aguas para su vertido o mejor aún, para su reutilización. La asociación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) usadas en agricultura (Bashan & de-Bashan, 2005); con plantas unicelulares como las microalgas, fue pensada para mejorar su crecimiento y capacidad de eliminar nutrientes durante el tratamiento de aguas residuales. La inoculación de plantas con PGPB es una práctica conocida en agricultura, aunque su comercialización y uso está limitado por la falta de resultados consistentes en distintos cultivos y estaciones. Recientemente, se ha probado su utilidad en dos especies de microalgas, no solamente como promotoras del crecimiento algal sino también por incrementar la producción y diversidad de metabolitos en las mismas. Las especies bacterianas del género *Azospirillum* se utilizan ampliamente como un inoculante para promover el crecimiento y rendimiento de numerosas plantas de cultivo, principalmente por afectar el metabolismo hormonal y la absorción de minerales de la plantas (Bashan et al., 2004). Así se espera que las bacterias mejoren el rendimiento de las microalgas, y estas respondan a la inoculación de bacterias como plantas superiores (de- Bashán & Bahsán, 2008).

El presente trabajo evaluó la capacidad de las microalgas del género *Chlorella Vulgaris* (CV) y las bacterias del género *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (PAC) y una combinación de ellas, para remover N y P del agua residual proveniente de la gestión de RSU. Por último, evaluar el efecto de su reutilización como biofertilizante en plantas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento e inmovilización de Microorganismos

Las bacterias del género *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (PAC) se cultivaron en caldo cetrimida (Nico et al., 2012). El cultivo creció con agitación continua (150 rpm) a 33°C hasta alcanzar la fase exponencial (DO 600nm 0,8).

Las microalgas del género *Chlorella vulgaris* (CV) crecieron en aireación continua con inyección diaria de dióxido de carbono gaseoso. El medio utilizado fue Bold's Basal Medium (BB) que contiene 1,25 gr L⁻¹ de NaNO₃, 0,125 gr L⁻¹ de CaCl₂·2H₂O, 0,375 gr L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0,375 gr L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,875 gr L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,125 gr L⁻¹ de NaCl, 1,55 gr L⁻¹ de KOH, 2,5 gr L⁻¹ EDTA, 0,247 gr L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O, 1 mL de H₂SO₄, 0,571 gr L⁻¹ de H₃BO₃, y micronutrientes. El pH del cultivo fue ajustado a 7 por adición de hidróxido de potasio.

La obtención de capsulas de microorganismos se realizó con la técnica de inmovilización en polímeros, a través de la cual se diseñaron esferas que contenían al microorganismo en una unidad: la cápsula (PAC ó CV). Se formó una emulsión que combinó los microorganismos resuspendidos en medio fresco y alginato al 2 % p/v en relación 1:10 siguiendo el protocolo descrito por Shoebitz et al., 2012.

Tratamientos de remoción biológica

Se utilizaron los siguientes tratamientos: PAC, CV, y su combinación (PAC+CV), mantenidos en cámara de cultivo con temperatura (30 °C ± 2), fotoperiodo (16-8 h), y en aireación constante durante todo el ensayo.

Se llevó a cabo un ensayo de 168 h de duración para determinar la evolución en la remoción biológica de ambos nutrientes a evaluar. Los microorganismos fueron inmovilizados dentro de una matriz tridimensional biodegradable, y colocados en erlenmeyer que contenían un medio Bold's Basal (BB) modificando las concentraciones de N y P, con el objetivo de alcanzar niveles típicos en aguas residuales provenientes de la gestión de RSU.

Para evaluar la remoción biológica en los distintos tratamientos se tomaron muestras diarias de los sobrenadantes de los tratamientos durante 7 días, para la determinación colorimétrica del contenido de N-NO₃ (Cataldo et al, 1975) y de P (Murphy & Riley, 1962).

Biofertilización

Se utilizaron semillas de *Solanum lycopersicum* de la variedad comercial Río Grande. Las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas durante 15 min en una solución que contiene hipoclorito de sodio 30% y Tritón X-100 0,1% y se lavó 2 veces con agua destilada estéril. Se cultivaron en bandejas alveoladas conteniendo arena/vermiculita (1:1).

Se realizó la inoculación con los microorganismos inmovilizados recuperados a los 7 días, en plántulas de tomate de 3 días, a los que se evaluaron los parámetros de promoción del crecimiento a los 30 días. Las microcápsulas recuperadas fueron colocadas junto a las plántulas de tomate y fueron mantenidas en cámara de cultivo Sanyo modelo MRL-350 durante todo el ensayo con un fotoperiodo de 12 h de luz a la temperatura de 20-25°C y humedad relativa de 85 %. Se regaron con H₂O (d) y una vez por semana con solución Hoagland (0,25% p/v) (Hoagland & Arnon, 1938).

Para la evaluación del efecto sobre la promoción del crecimiento, se secó el material durante 48 hs con estufa a 80 °C. Luego se realizó un pesaje de la biomasa total, aérea y radical de los diferentes tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se puede observar una reducción mayor en el contenido de P a las 12 hs en el tratamiento donde bacteria y alga coexistieron (54,1 %). A las 48 hs alcanzó valores del 64 al 75 % para los distintos tratamientos. La combinación PAC + CV resultó ser la más efectiva en la remoción a lo largo del ensayo.

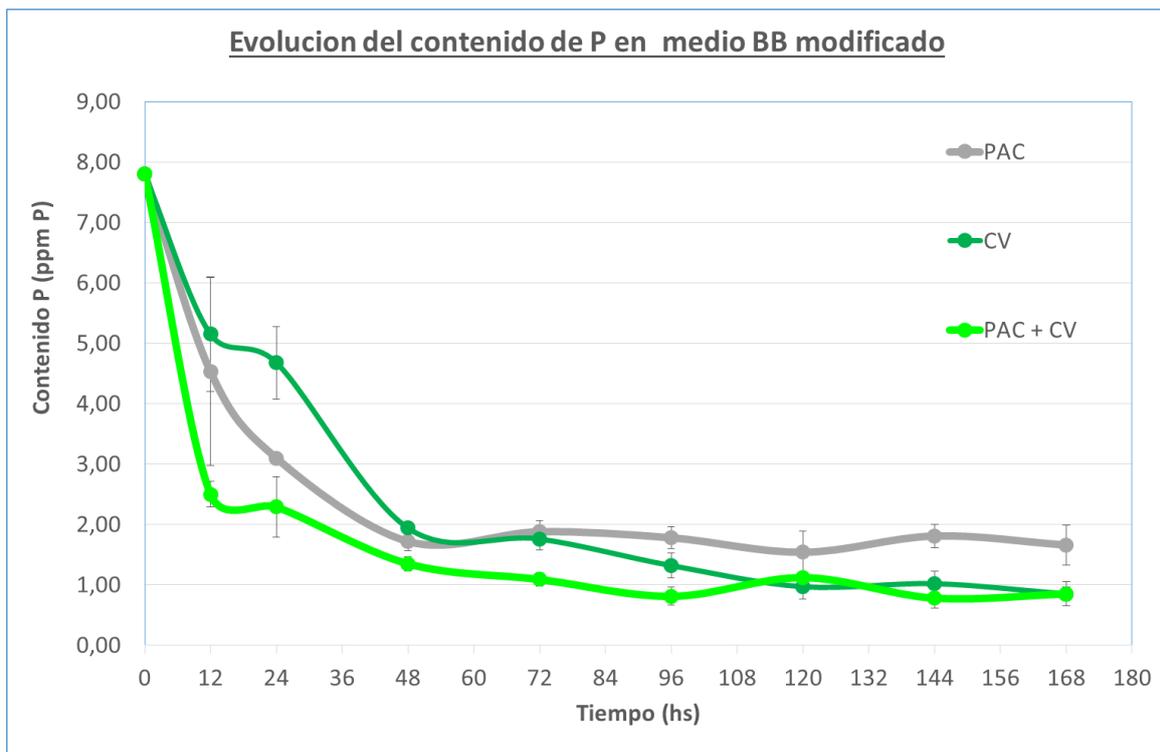


Figura 1. Evolución del contenido de P (ppm de P) en medio BB modificado para tratamiento con PAC (círculos), CV (triángulos) y combinación con PAC + CV (cuadrados).

En la figura 2, se puede ver que la combinación PAC + CV mostró el mayor porcentaje de remoción de N-NO₃ entre los tratamientos a partir de las 12 hs, y alcanzó la máxima tasa de reducción a las 48 hs.

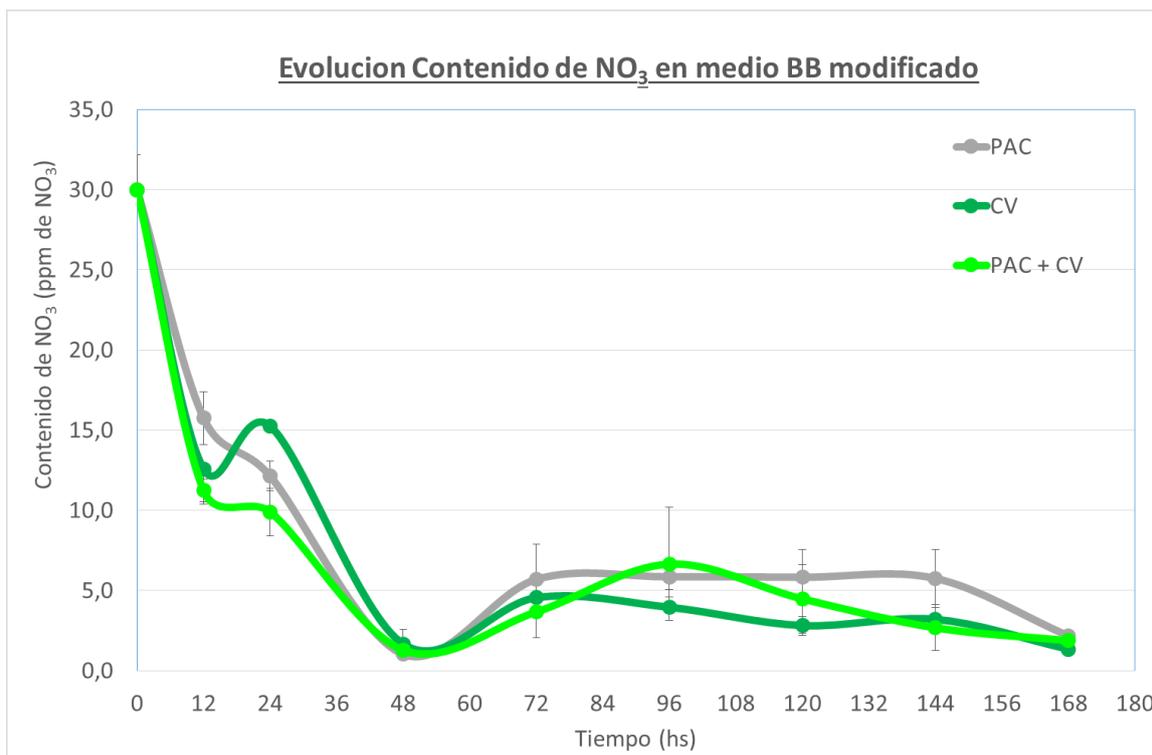


Figura 2. Evolución del contenido de NO₃ (ppm de NO₃) en medio BB modificado para tratamiento con PAC (círculos), CV (triángulos) y combinación con PAC + CV (cuadrados).

En cuanto a la respuesta de plantas de tomate a la biofertilización con las cápsulas, se observó un leve aumento de entre un 3 a 7 % en el peso aéreo respecto al tratamiento control, que no resultó en diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en la parte radical los resultados fueron más evidentes, como se aprecia en la Figura 3, donde se registraron incrementos de entre 20 a 23 % en el peso seco radical sobre el tratamiento control.



Figura 3. Promoción del crecimiento obtenido de la biofertilización en Tomate (Var. Río grande) con cápsulas recuperadas del ensayo de remoción de nutrientes a los 30 días de la siembra Aumentos de entre 20 a 23 % en el peso seco radical sobre el tratamiento control, para aquellas plantas biofertilizadas con capsulas de tratamientos con PAC en su interior.

CONCLUSIONES

- Este trabajo nos permite ver que tanto las algas como las bacterias resultaron ser eficaces en la remoción de los excedentes de N y P y que este mecanismo fue efectivo en tiempos cortos. Esto resulta fundamental porque permite ahorrar tiempo y dinero en los tratamientos de depuración in situ. El

tratamiento del medio BB modificado con N y P, fue depurado en forma significativa a las 48 hs de iniciado el ensayo. Si bien para el caso de la remoción de P, la combinación PAC + CV resultó la más efectiva desde tiempos tempranos de iniciado el muestreo, a lo largo de todo el ensayo la bacteria PAC por sí misma fue capaz de remover el exceso de N y P.

- De la evaluación de las cápsula como biofertilizante se deduce que en la promoción del crecimiento se obtuvo un mayor desarrollo de las plantas en las que el tratamiento PAC estuvo presente, atribuible en parte al ácido indol acético (AIA) sintetizado por la bacteria, que se reflejó principalmente en un aumento del sistema radical (Ribaudó et al., 2016).

Un desafío para las próximas investigaciones será evaluar este sistema de remoción biológica de nutrientes en las aguas provenientes de la gestión de RSU y de la actividad agropecuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan, L. (2004). Azospirillum–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol* 50:521-577.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E. (2005). Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1795-1804.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2008). Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *App and Env Microbiol* 74: 6797–6802.
- El Hadrami, A., Adam, L.R., Daayf, F. (2011). Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing anti-microbial metabolites. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 328-335.
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends biotechnol* 20: 338-343.
- Hoagland, D. R., Arnon, D.I. (1938). The water culture for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347, 461-462.
- Lebeau, T., Robert, J.M. (2006). Biotechnology of immobilized micro algae: a culture technique for the future? In: Rao, S. (Ed.), *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp. 801-837.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource technol*: 3949-3964.
- Nico, M., Ribaudó, C.M., Gori, J.I., Cantore, M.L., Curá, J.A. (2012). Phosphate uptake and vegetative growth promotion in glucose-exuding plants (*Oryza sativa*) inoculated with Plant Growth Promoting Bacteria. *Appl Soil Ecol* 61: 190-195.
- Schoebitz, M., Simonin, H., Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *J Microencapsul* 29:532–538.
- Tam, N.F.Y., Wong, W.S. (2000). Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. *Env Pollut* 110, 195–205.